



リゾホスファチジン酸による血管形成制御機構の解析

著者	雪浦 弘志
号	48
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博10号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121673

リゾホスファチジン酸による血管形成制御機構の解析

分子細胞生化学分野 雪浦 弘志

【背景】

リゾホスファチジン酸 (LPA) は、グリセロール骨格に 1 本の脂肪酸とリン酸が結合した単純な構造のリゾリン脂質であるが、LPA 特異的な 6 種類の GPCR (LPA₁-LPA₆) を介して多彩な生理的・病的機能を発揮する (図 1)。LPA は血中では主にリゾホスファチジルコリン (LPC) が分泌型酵素であるオートタキシン (ATX) に加水分解されることで産生さ

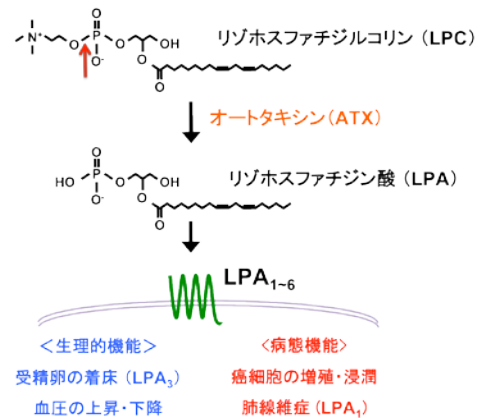


図 1 LPA 産生酵素、LPA 受容体

れる。当研究室において ATX ノックアウト (KO) マウスが作製・解析され、ATX KO マウスは血管形成異常を伴い胎生致死であることが明らかとなった。一方、*in vitro* で LPA 分解活性を有する Lipid phosphate phosphatase 3 (LPP3) の KO マウスも血管形成異常を示すことが報告されていることから、LPP3 が LPA の量を制御し血管形成に寄与している可能性が想定される。このように LPA はその産生酵素や分解酵素の機能を抑制することで血管形成異常を示すことから、生体にとって重要な血管新生因子であることが明らかとなってきた。しかしながら LPA がどのように血管形成を制御しているのか詳細な機能やその分子メカニズムなどは不明である。また LPA はその基質である LPC と産生酵素である ATX が細胞外に存在するため、一見無制御に産生され続けるように思える。しかし、この LPA レベルがどのように制御されているのかは不明なままである。

私は、LPA の産生酵素、受容体、分解酵素の網羅的な解析から、血管形成における LPA の機能、制御機構を探ろうと考え、研究を行った。

【方法と結果】

1, ゼブラフィッシュにおいても ATX をノックダウンすると血管形成異常を生じる

血管形成を詳細に観察でき、容易に遺伝子の機能を抑制できるゼブラフィッシュを用いて LPA の血管形成における機能の解析を試みた。

血管内皮細胞に EGFP を発現するトランスジェニック (Tg) フィッシュ (*fli1:EGFP*) 胚に ATX に対するアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) をインジェクションすることで、ATX をノックダウンし、血管形成を観察した。その結果 ATX ノックダウン胚では体節間血管 (intersegmental vessel, ISV) と呼ばれる血管の伸長が遅れることが明らかとなった (図 2)。この血管形成異常のメカニズムを探るために、内皮細胞で核移行型 EGFP を発現する Tg (*fli1: nEGFP*) フィッシュを用いて解析した。結果、ATX ノックダウン胚では血管一本当たりの細胞数は変わらず、血管の先端の細胞が背側に遊走できなくなっていることがわかった。次に血管形成に関与する受容体を同定するために、LPA 受容体を単独または複数を組み合わせてノックダウンし、血管形成を観察した。その結果ゼブラフィッシュでは LPA₁, LPA₄, LPA_{6a}, LPA_{6b} が血管形成に関係する受容体だと考えられた。

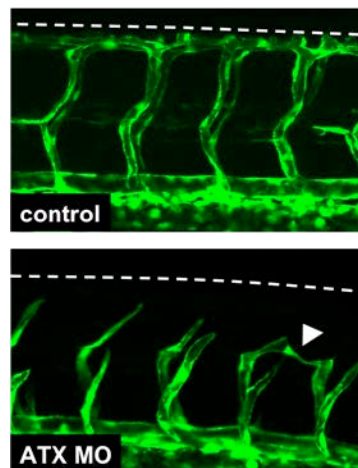


図 2 ATX ノックダウンによる血管形成異常

ATX をノックダウンすると ISV の伸長が止まり、横の血管と異常な結合を形成する (矢印)。点線：背側

2, LPP3 ノックダウンによって生じる血管形成異常は LPA_{6a} への過剰なシグナルによるものである

次に、LPA 分解酵素である LPP3 に着目し、解析を行った。ゼブラフィッシュには LPP3 遺伝子が 2 つあったためその 2 つを LPP3a, LPP3b とした。LPP3a, 3b をノックダウンしたところ、LPP3a ノックダウン時には管腔の未形成や血管の結合が切れて退縮している様子がしばしば観察された (図 3)。しかし、LPP3b のノックダウンでは特に血管に異常が見られなかったことからゼブラフィ

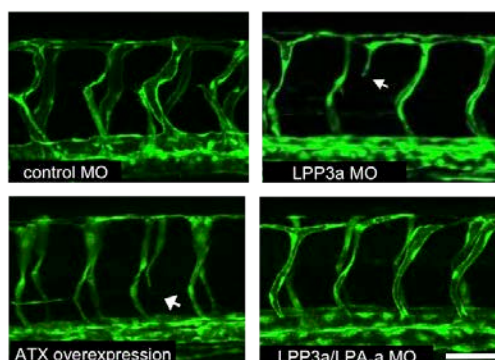


図 3 LPP3a ノックダウンによる血管形成異常

LPP3a ノックダウンまたは ATX 過剰発現により血管の退縮が生じる (矢印)。LPP3a ノックダウンによる異常は LPA_{6a} のノックダウンによりレスキューされる。

ッシュでは LPP3a が血管形成に重要であると考えられた。そこで、この LPP3a ノックダウンによる異常が LPA シグナルを介しているのかを検証するために、LPA 産生酵素である ATX を過剰発現させ、LPA 量を増加させることで LPP3a ノックダウン時と同様に血管の退縮や管腔の未形成が引き起こされるかどうかを調べた。その結果、ATX の過剰発現により、LPP3a ノックダウン時と同様の血管形成異常が観察された（図 3）。

次に LPP3a と LPA 受容体を同時にノックダウンしたところ、LPA_{6a} を同時にノックダウンした場合血管の退縮と管腔の未形成がレスキューされた（図 3）。以上の結果より、通常時では LPA を LPP3a が分解することで、LPA_{6a} に作用する LPA 量を調節しており、LPP3a がノックダウンされた場合は、過剰な LPA が LPA_{6a} に作用し、管腔の未形成・血管の退縮が生じているものと考えられる。

3, LPA は内皮細胞間接着を弱める

LPA の細胞レベルでの機能を探るため、human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) を用いて解析を行った。コンフルエントまで培養した HUVEC を LPA 刺激したところ、アクチンストレスファイバー形成が促進され、内皮細胞間接着に重要である VE-cadherin の局在が変化し、細胞間接着が弱まっている様子が観察された（図 4）。siRNA を用いたノックダウン実験から、この LPA の作用は LPA₆ 受容体を介していることが明らかとなった。また LPA 分解酵素である LPP3 をノックダウンすると LPA の作用が増強されることがわかった。LPA₆ の下流シグナルを調べたところ、LPA 刺激により G α_{13} /RhoA/ROCK 経路が活性化していることが示唆された。

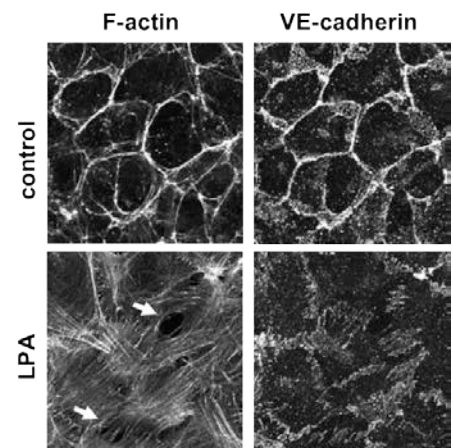


図 4 LPA 刺激による内皮細胞の変化
LPA 刺激によりアクチンストレスファイバーが形成され、VE-cadherin の局在が変化し、細胞間にギャップが形成される（矢印）。

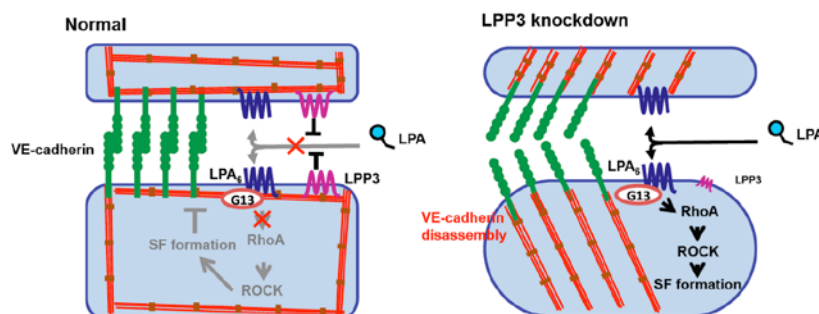


図 5 LPA, LPP3 による内皮細胞間接着制御のモデル図

4, LPA は非接着面において作用しやすい

興味深いことに、HUVEC を用いた解析を行う中で、細胞の接着状態によって LPA に対する感受性が変化することがわかった。コンフルエントまで培養した HUVEC を、チップを用いてスクラッチし、一つの細胞で接着面と非接着面を作り出し、LPA 刺激したところ非接着面で強くアクチンストレスファバーを形成すること

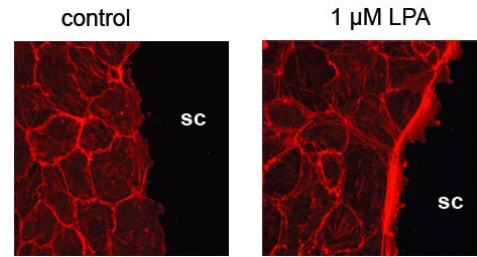


図 6 LPA は非接着面で強くアクチンストレスファバー形成を促進する
sc: scratch area

がわかった (図 6)。また LPP3 の局在を調べたところ、LPP3 は細胞間接着部位に局在していた。この結果から LPP3 の存在する細胞間接着部位では LPA のシグナルが入りづらく、非接着面で LPA のシグナルが入りやすいことが示唆された。

【まとめと考察】

ゼブラフィッシュを用いた解析から、ATX-LPA シグナルの減弱は血管の伸長を抑制することが明らかとなった。逆に、LPA の過剰なシグナルは血管の伸長にはあまり影響を与えず、管腔形成を抑制し、血管退縮を促進した。LPA シグナルが減弱した際には主に血管の先端にいる内皮細胞に影響が出たが、LPP3 をノックダウンし、LPA シグナルが過剰になった場合には血管の先端の細胞にはほとんど影響は出ず、他の内皮細胞に異常が生じた。

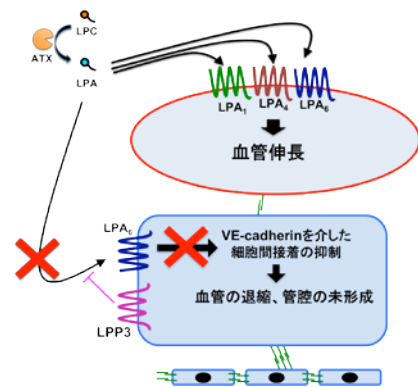


図 7 LPA 作用部位の想定図

このことから、通常時には LPA シグナルはある一部の内皮細胞にのみ作用し、他の内皮細胞は LPP3 により LPA シグナルが入りづらい状況になっていることが想定される (図 7)。今回の研究から細胞外で産生される LPA は LPA 受容体がある部位ならどこでも作用するわけではなく、その作用する部位は LPP3 によって厳密に制御されていることがわかった。このように LPA シグナルは産生酵素、受容体、分解酵素によって緻密に調節され、血管形成に寄与していることが明らかとなった。

論文提出者：雪浦 弘志

論文審査委員（主査）：青木 淳賢

論文題目：リゾホスファチジン酸による血管形成制御機構の解析

リゾホスファチジン酸 (LPA) はリン脂質メディエーターの一つであり、6 種類の LPA 特異的な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して多様な機能を示す。この LPA は主に分泌型タンパクであるオートタキシン (ATX) により産生される。ATX のノックアウトマウスは胎生期に血管形成異常を伴い致死であることが明らかにされているが、血管形成に寄与している LPA 受容体やその詳細な機能は不明であった。また LPA はその産生酵素の ATX と基質であるリゾホスファチジルコリン (LPC) がともに細胞外に存在するため、細胞外では一見無制御に産生され続ける。しかし生体内の LPA レベルは非常に低く (数十 nM レベル) 保たれており、何らかの LPA 濃度を抑制する制御機構の存在が示唆される。申請者はヒト内皮細胞やモデル生物としてゼブラフィッシュを用いて LPA 関連遺伝子の血管形成における機能を探索した。本研究の主な成果は以下の通りである。

1. ゼブラフィッシュにおいても ATX が血管形成に重要な因子であることを明らかにし、ATX-LPA シグナルが血管伸長に重要であることを明らかにした。またゼブラフィッシュにおいて ATX-LPA シグナルには LPA₁, LPA₄, LPA₆ 受容体が関与することを示した。
2. LPA 分解酵素である Lipid phosphate phosphatase 3 (LPP3) がゼブラフィッシュの血管形成において重要であり、LPP3 をノックダウンすると血管の退縮・管腔の未形成といった異常が生じることを明らかにした。またこの LPP3 ノックダウンによる血管形成は LPA₆ 受容体が過剰に活性化し、VE-cadherin による接着が減弱した結果であることも示した。
3. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、LPA が LPA₆/Gα₁₃/RhoA/ROCK 経路を介してアクチンストレスファイバー形成を促進し、VE-cadherin による内皮細胞間接着を抑制することを示した。さらに通常時には LPP3 が内皮細胞に発現しており、LPA シグナルを負に制御していることを明らかにした。さらに LPP3 の発現部位は細胞接着に依存して局在変化し、sub-cellular レベルで LPA シグナルを制御していることを示した。

以上の結果は血管形成における LPA 機能とその制御機構を詳細に解明したものである。またこれまで不明であった細胞外で産生される LPA の制御機構として LPP3 の役割を明確に示した。よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として合格と認める。